

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

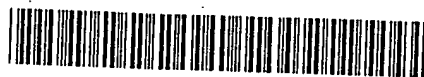
IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

AO



Office européen des brevets



(11)

EP.0 967 274 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

29.12.1999 Patentblatt 1999/52

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/10**

(21) Anmeldenummer: 99250187.4

(22) Anmeldetag: 14.06.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 15.06.1998 DE 19826758

(71) Anmelder: **Mologen GmbH**
14195 Berlin (DE)

(72) Erfinder:

- Wittig, Burghardt
14195 Berlin (DE)
- Junghans, Claas
14195 Berlin (DE)
- Schroff, Matthias
14195 Berlin (DE)

(54) **Verfahren zur Reinigung von kovalent geschlossenen DNA-Molekülen**

(57) Die Erfindung betrifft eine Methode, mit der hantelförmige Expressionskonstrukte aus Plasmid-DNA hergestellt werden können. Die Rumpfmoleküle werden als Teile von Plasmiden vermehrt, isoliert, die hantelförmigen Moleküle durch Ligation mit Oligodesoxyribonukleotiden synthetisiert und durch anschließenden sequenzspezifischen Verdau der unerwünschten Nebenprodukte durch Endo- und Exonukleasen gereinigt. Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Methode zur Reinigung von in biotechnologischen Verfahren hergestellten Nukleinsäurepräparationen.

(10)

A

tionsgemisch als Polymere verbleiben. Dies führt dazu, daß im Reaktionsgemisch nur eine Spezies langkettiger DNA-Moleküle vorliegt, wodurch diese der Aufreinigung durch bekannte Methoden der Ionenaustauschchromatographie zugänglich ist.

[0008] Werden zum Verdau des Plasmids bakterielle Restriktionsendonukleasen der Klasse I eingesetzt, so entstehen durch den Verdau Überhänge palindromischer Sequenz. Dies bedeutet, daß diese Überhänge einen Strang eines Doppelstrang-Motivs mit diadischer Symmetrie darstellen; eine andere Form dieser Aussage ist, daß alle von der betreffenden Endonuklease hergestellten Fragmente mit allen anderen von der betreffenden Endonuklease hergestellten Fragmenten ligieren können. Das führt dazu, daß man zur Vermeidung von Ligationsreaktionen zwischen den langen Expressionskassetten einen großen Überschuß an kurzen Oligodesoxyribonukleotiden zusetzen muß. Es mußte in Versuchen zur Ligation in Abhängigkeit von der Länge der zu ligierenden Fragmente und deren Konzentration ein bis zu 200-facher Überschuß an Oligomeren in Bezug auf die Enden der zu ligierenden Restriktionsfragmente eingesetzt werden. Dies ist der Fall, weil die Restriktionsfragmente intra- und intermolekular mit anderen Restriktionsfragmenten reagieren können. Der genannte Überschuß an Haarnadel-Oligomeren verschiebt das Gleichgewicht von der intra- oder intermolekularen Reaktion eines polymeren Restriktionsfragmentes mit einem anderen ganz auf die Seite der Reaktion mit den Oligomeren, führt aber zu einem sehr hohen Anteil der Oligo-Dimere im Reaktionsgemisch. Neben den dadurch entstehenden Kosten ist daran nachteilig, daß diese Oligomere als teilweise einzelsträngige DNA-Moleküle in einem so hohen Überschuß enzymatische Reaktionen unspezifisch hemmen können.

[0009] Ein weiterer Aspekt der hier vorgestellten Erfindung ist, daß die Menge der haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotide, die zur Ligation an die durch Restriktionsverdau entstandenen Fragmente erheblich vermindert werden kann, wenn man die Ligation in Anwesenheit von Restriktionsendonukleasen ablaufen läßt, die im Verlaufe der Ligation entstehenden unerwünschten Verbindungen aus Ligationspartnern in-situ wieder lösen. Ligieren dabei zwei aus Verdau mit der gleichen Endonuklease entstandene polymeren Restriktionsfragmente miteinander, so rekonstituieren sie wieder die ursprüngliche Schnittstelle. Diese Reaktion läßt sich in-situ durch Verdau mit der betreffenden Endonuklease rückgängig machen.

[0010] Um dabei die Ligation von Oligomeren an die Restriktionsfragmente nicht ebenfalls wieder rückgängig zu machen, muß die direkt neben dem Überhang liegende Sequenz der Oligomere so gewählt werden, daß sie bei Ligation an die Restriktionsfragmente die Schnittstelle nicht rekonstituiert. Vorteilhafterweise wird diese Sequenz vielmehr so gewählt, daß eine nicht palindromische Sequenz bei Ligation des Oligomers an den Überhang des Restriktionsfragmentes entsteht, die vor weiterem Verdau geschützt ist, und ebenfalls so, daß bei Reaktion des Oligomers mit einem weiteren Exemplar Oligomer passender Sequenz ein Dimer entsteht, so daß eine palindromische Sequenz entsteht, die durch eine zweite, in der Reaktionslösung enthaltene Endonuklease wieder gespalten werden kann. Auf diese Weise können in einem Eintopfverfahren durch eine Ligase und zwei Endonukleasen relativ kleine Überschüsse Haarnadel-Oligomere (ca. 10- bis 30-fach) ausreichen, zu einem definierten Produkt aus linearen kovalent geschlossenen Monomeren des Expressionskonstruktes sowie der begleitenden, später abgetrennten Fremdsequenzen zu kommen. Dies kann zum Beispiel dadurch erreicht werden, daß man zum Verdau in das Plasmid eine die Expressionskassette flankierende Erkennungssequenz für die Endonuklease EcoRI (G'AATTC; „' bezeichnet die Schnittstelle, Überhang AATT) einbaut, die 5'-überhängende Sequenz des Oligos mit AATT beginnen läßt und den sich daran anschließenden Doppelstrangbereich des Haarnadel-Oligos mit G beginnen läßt. Auf diese Weise entsteht bei Ligation zwischen dem Haarnadel-Oligo und der Expressionskassette eine nicht-palindromische Sequenz GAATTG, bei Reaktion einer Expressionskassette mit einer anderen wird die EcoRI-Schnittstelle wiederhergestellt, und bei Reaktion eines Oligos mit einem anderen kann das entstehende Dimer durch die Endonuklease MnuI geschnitten werden (siehe Beispiel 2).

[0011] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von sogenannten Klasse-II Endonukleasen, welche im Gegensatz zu den heute zumeist verwendeten Klasse-I Endonukleasen keine palindromischen Sequenzen erkennen (Butkus et al., Biochim Biophys Acta 1985 Dec 18;826(4):208-12 A new restriction endonuclease Eco311 recognizing a non-palindromic sequence). Durch die Entstehung nichtpalindromischer Überhänge können die Enden nicht mehr mit jedem anderen Ende reagieren. Da bei den Klasse-II-Endonukleasen die Schnittstellen neben den Erkennungssequenzen liegen, können auch die Reaktivitäten von Edukt und Produkt getrennt werden. Durch Platzierung der Erkennungssequenz auf dem Plasmid jenseits der gewünschten Produktsequenz kann ein religiertes Fragment des Plasmids durch in der Ligationslösung anwesende Endonuklease immer wieder geschnitten werden, während die mit Oligonukleotid ligierte Expressionskassette unreaktiv bleibt. Auf diese Weise kann die Menge an Oligodesoxyribonukleotid auf etwa einen fünffachen Überschuß in Enden gesenkt werden.

[0012] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist, daß der Verdau der DNA-Präparation mittels sequenzspezifischer Endonukleasen sowie nachfolgendem Verdau mit sequenzunspezifischen Exonukleasen alle DNA aus der Präparation zu entfernen vermag, welche der Endonuklease eine Erkennungssequenz liefert und als Verunreinigung in der DNA enthalten ist. Heute in der medizinischen Anwendung bzw. klinischen Prüfung befindliche DNA-Plasmidpräparationen weisen einen erheblichen Grad an Verunreinigung mit genomischer DNA der zur Herstellung verwendeten Mikroorganismen auf. So spezifiziert ein führender Hersteller von GMP-zugelassener DNA für klinische Prüfungen den Gehalt an „Host DNA auf <5% (Quelle: Katalog der Qiagen GmbH auf dem Internet, Eintrag vom 11.06.1999 auf der

EP 0 967 274 A2

Sequenzen:

Numeric Identifier		
110	applicant	Mologen GmbH
120	title	Darstellung von linearen kovalent geschlossenen DNA-Molekülen als Expressionskonstrukte
130		
140	current application	
141	current filing date	14.06.99
150	Earlier patent application	
151	Earlier application filing date	15.6.98
160	Number of seq ID Nos	2
170	Software	MacMolly for Apple PowerPC, 8.0 available free from http://www.mologen.com
	Information	1 (pG-EGFP)
211	Length	4397
212	Type	DNA
213	Organism	artificial

Seq ID 1: pG-EGFP

TCTTCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG
 GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT
 CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC
 AGGAACCGTA AAAAGCCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCCC
 CCCTGACGAG CATCAAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC
 CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCCTG
 CCTCTCCTG TTCCGACCCT GCGGCTTACC GGATACCTCT CCGCCTTTCT
 CCTTCGGGA AGCGTGCGC TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
 GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC
 GTTCAGCCCC ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA
 CCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA
 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG
 CCTAATACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
 GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC
 AAACCAACGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG
 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC
 TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT
 TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAATA ATGAAGTTT
 AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
 CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA

EP 0 967 274 A2

GTACAACTAC AACAGCCACA ACGTCTATAT CATGGCCGAC AAGCAGAAGA
 ACGGCATCAA GGTGAAC TTC AAGATCCGCC ACAACATCGA GGACGGCAGC
 GTGCAGCTCG CCGACCACTA CCAGCAGAAC ACCCCCATCG GCGACGGCCC
 CGTGCTGCTG CCCGACAACC ACTACCTGAG CACCCAGTCC GCCCTGAGCA
 AAGACCCCAA CGAGAAGCGC GATCACATGG TCCTGCTGGA GTTCGTGACC
 GCCGCCGGGA TCACTCTCGG CATGGACGAG CTGTACAAGA GCTCATAATC
 AGCCATACCA CATTTGTAGA GGT TTTACTT GCTTTAAAAA ACCTCCCACA
 CCTCCCCCTG AACCTGAAAC ATAAAATGAA TGCAATTCTT GTTGTTAACT
 TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT
 TTCACAAATA AAGCATTTTT T TCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA
 ACTCATCAAT GTATCTTAAC GCGAATTGTT GTTGTTAACT TGTTTATTGC
 AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA
 AAGCATTTTT T TCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT
 GTATCTTAAC GCGAATTCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA
 ATTGTTATCC GCTCACAAAT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG
 TGTAAGCCT GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT
 GCGCTCACTG CCCGCTTTCC AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT
 AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT TGGGCGC

EP 0 967 274 A2

GTTATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
 TAGTTGCCCTG ACTCCCGCTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
 CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC
 TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA
 CTGCTCTGTC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTCCCGG
 GAGGTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC
 CATGTGTACA GGCATCGTGG TGTACCGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT
 TCGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGCTG
 TCCAAAAAG CGGTAGCTC CTTCGGTCTT CCGATCCTTG TCAGAAGTAA
 GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATCTC
 TCACTCTCAT GCCATCCCTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA
 ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC
 GGCCTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAGTGC
 TCATCAATTG AAAACCTTCT TCGGGCGGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
 CTTGTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGACCCCA ACTGATCTTC
 AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
 AATAAGCCGC AAAAAAGGCA ATAAGGCCGA CACGGAATG TTGAATACTC
 ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTCTCT
 CATGAGCGGA TACATAATTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG
 TTCCCGGCAC ATTTCCCGCA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCAT
 ATTATCATGA CATTAACTTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCTTTCTG
 TCTCCGCGCT CTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC
 CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC
 CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTGGCGGG TGTCCGGGGCT GGCTTAACCTA
 TGCGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CGGTGTGAAA
 TACCGCACAG ATCGGTAAGC AGAAATACC GCATCAGGCG CCATTGCGCA
 TTCAGCTGCG GCAACTCTTG GGAAGGGCGA TCGGTGCGGG CCTCTTCGCT
 ATTACGCGAG CTGGCGAAAG GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTTGGG
 TAACGCGCAGG GTTTTCCAG TCACGACGTT GTAAAACGAC GGCAGTGCC
 AAGCTTGGTC TCCCCCTGGA TCCGCTAGCT TAACCGTATT ACCGCCATGC
 ATTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATTA
 TATCCAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGCCCGG CCTGGCTGAC
 CGCCCAACGA CCCCCGCCCC TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATA
 GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG AGTATTTACG
 GTAACCTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC
 CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCCA
 TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT
 CATCGCTATT ACCATGGTGA TCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG
 GATAGCGGTT TGACTCAGG GGATTTCACG GTCTCCACCC CATTGACGTC
 AATGGGAGTT TGTTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTT CAAAATGTGG
 TAACCACTCC GCCCCATTGA CGCAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG
 AGGTCTATAT AAGCAGAGCT GGTTTAGTGA ACCGTACAGT GGTACCGAAG
 TGGCTAGCGC TACCGGTGCG CACCATGGTG AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT
 CACCGGGGTC GTGCCCATCC TGSTCGAGCT GGACGGCGAC GTAAACGGCC
 AGAATTTCA GGTGTCCGGC GAGGCGGAGG GCGATGCCAC CTACGGCAAG
 CTGACCTTGA AGTTCACTG CACCACGGC AAGCTGCCCC TGCCCTGGCC
 CACCCCTGTC ACCACCTGA CCTACGGCGT GCAGTGCCTT AGCCGCTACC
 CCGACCATAT GAAGCAGCAC GACTTCTTCA ACTCCGCCAT CCCCAGAGGC
 TACGTCCAGG AGCGCACCAT CTTCCTCAAG GACGACGGCA ACTACAAGAC
 CCGCGCGGAG GTGAAGTTCG AGGGCGACAC CCTGGTGAAC CGCATGAGG

EP 0 967 274 A2

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die besagte Endonuklease zum Primärverdau ein Enzym der Gruppe der Klasse-II-Restriktionsendonukleasen, vorzugsweise ein Enzym aus der Gruppe BbsI, BbvI, BbvII, BpiI, BsaI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspMI, Eam1104I, EarI, Eco31I, Esp3I, FokI, HgaI, SfaNI oder deren Isoschizomere ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, bei dem das Verfahren durch festphasengebundene Enzyme durchgeführt wird.

6. Verfahren zur Reinigung von Präparationen kovalent geschlossener DNA-Moleküle, dadurch gekennzeichnet daß die DNA-Präparation einem Verdau mit Exonukleasen, welche für freie Hydroxy- oder Phosphatgruppen von Desoxyribonukleinsäure spezifisch sind, vorzugsweise die Exonukleaseaktivitäten der DNA-Polymerase der Bakteriophagen T4 oder T7, ausgesetzt und dann einer Abtrennung der verwendeten Enzyme, Pufferbestandteile sowie hydrolysierten Nukleotide unterzogen wird.

7. Verfahren zur Reinigung von Präparationen kovalent geschlossener DNA-Moleküle, dadurch gekennzeichnet daß

- die DNA-Präparation einem Verdau durch eine oder einer Vielzahl von Restriktionsendonukleasen in einem für die Aktivität der besagten Restriktionsendonukleasen geeigneten Medium ausgesetzt wird, wobei die zu reinigenden DNA-Moleküle keine Erkennungssequenzen für die verwendeten Restriktionsendonukleasen aufweisen, und
- die DNA-Präparation anschließend oder gleichzeitig einem Verdau mit Exonukleasen, welche für freie Hydroxy- oder Phosphatgruppen von Desoxyribonukleinsäure spezifisch sind, vorzugsweise die Exonukleaseaktivitäten der DNA-Polymerase der Bakteriophagen T4 oder T7, ausgesetzt und dann einer Abtrennung der verwendeten Enzyme, Pufferbestandteile sowie hydrolysierten Nukleotide unterzogen wird.

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 967 274 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
12.04.2000 Patentblatt 2000/15

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/10**

(43) Veröffentlichungstag A2:
29.12.1999 Patentblatt 1999/52

(21) Anmeldenummer: 99250187.4

(22) Anmeldetag: 14.06.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 15.06.1998 DE 19826758

(71) Anmelder: **Mologen GmbH**
14195 Berlin (DE)

(72) Erfinder:
• Wittig, Burghardt
14195 Berlin (DE)
• Junghans, Claas
14195 Berlin (DE)
• Schroff, Matthias
14195 Berlin (DE)

(54) Verfahren zur Reinigung von kovalent geschlossenen DNA-Molekülen

(57) Die Erfindung betrifft eine Methode, mit der hantelförmige Expressionskonstrukte aus Plasmid-DNA hergestellt werden können. Die Rumpfmoleküle werden als Teile von Plasmiden vermehrt, isoliert, die hantelförmigen Moleküle durch Ligation mit Oligodesoxyribonukleotiden synthetisiert und durch anschließenden sequenzspezifischen Verdau der unerwünschten Nebenprodukte durch Endo- und Exonukleasen gereinigt. Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Methode zur Reinigung von in biotechnologischen Verfahren hergestellten Nukleinsäurepräparationen.

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 25 0187

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

18-02-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9213963 A	20-08-1992	KEINE	
WO 9313216 A	08-07-1993	CA 2126438 A	08-07-1993
		EP 0620858 A	26-10-1994
		JP 8500721 T	30-01-1996
		US 5354670 A	11-10-1994
WO 9821322 A	22-05-1998	DE 19648625 A	14-05-1998
		AU 5308698 A	03-06-1998
		DE 19781276 D	30-09-1999
		EP 0941318 A	15-09-1999
EP 0430270 A	05-06-1991	DE 3939771 A	06-06-1991
		AT 133705 T	15-02-1996
		AU 648281 B	21-04-1994
		AU 6708390 A	06-06-1991
		CA 2031286 A	02-06-1991
		DE 59010101 D	14-03-1996
		DK 430270 T	28-05-1996
		ES 2084637 T	16-05-1996
		GR 3019086 T	31-05-1996
		IE 71193 B	12-02-1997
		JP 3191777 A	21-08-1991
		PT 96048 A, B	13-09-1991
		US 5369029 A	29-11-1994